

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-298880

(43)公開日 平成7年(1995)11月14日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12N 9/24

L

A61K 47/36

C07H 3/04

C12P 19/14

Z 7432-4B

// A23L 1/236

A

審査請求 未請求 請求項の数 20 FD (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-72533
 (22)出願日 平成7年(1995)3月7日
 (31)優先権主張番号 特願平6-59834
 (32)優先日 平6(1994)3月7日
 (33)優先権主張国 日本 (JP)

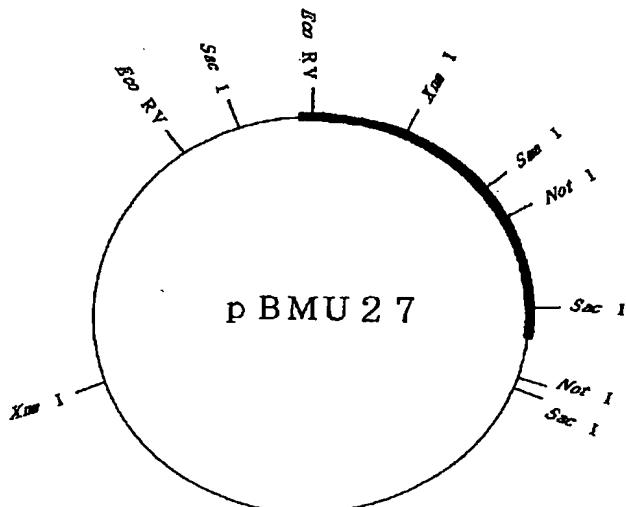
(71)出願人 000155908
 株式会社林原生物化学研究所
 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
 (72)発明者 久保田 優夫
 大阪府茨木市主原町12番6号
 (72)発明者 津▲さき▼桂二
 岡山県倉敷市福田町古新田472番地
 (72)発明者 服部 和子
 岡山県邑久郡牛窓町牛窓3849番地
 (72)発明者 杉本 利行
 岡山県岡山市東畦695番44号

(54)【発明の名称】組換え型酵素とその製造方法並びに用途

(57)【要約】

【目的】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素と、その酵素の製造方法並びに用途を提供する。

【構成】 特定の作用を有する組換え型酵素と、その組換え型酵素を产生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法と、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に組換え型酵素を作用させてその非還元性糖質からトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の変換方法を構成とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素。

【請求項2】 下記の理化学的性質を有する請求項1に記載の組換え型酵素。

(1) 分子量

約57,000乃至68,000ダルトン (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.3乃至4.6 (等電点電気泳動)

【請求項3】 配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相同意なアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載の組換え型酵素。

【請求項4】 請求項1に記載の組換え型酵素を產生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法。

【請求項5】 組換え型酵素が下記の理化学的性質を有する請求項4に記載の組換え型酵素の製造方法。

(1) 分子量

約57,000乃至68,000ダルトン (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.3乃至4.6 (等電点電気泳動)

【請求項6】 組換え型酵素が配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相同意なアミノ酸配列を有する請求項4又は5に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項7】 形質転換体が、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素をコードするDNAと自律複製可能なベクターを含む組換えDNAを適宜宿主に導入してなる請求項4、5又は6に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列かそれに相同意な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号5又は6に示す塩基配列を有する請求項7、8又は9に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項11】 DNAがリゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属又はミクロコッカス属の微生物に由来する請求項7、8、9又は10に記載の組

【特許請求の範囲】

【請求項12】 宿主が大腸菌である請求項7、8、9、10又は11に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項13】 自律複製可能なベクターがプラスミドベクターBlue script II SK (+) である請求項7、8、9、10、11又は12に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項14】 形質転換体を炭素源及び窒素源を含むpH2乃至8の液体培地に植菌し、温度25乃至65°Cで1乃至6日間培養する請求項4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項15】 培養物中の組換え型酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び/又は等電点電気泳動により採取する請求項4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14に記載の組換え型酵素の製造方法。

【請求項16】 末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に請求項1に記載の組換え型酵素を作用させて該非還元性糖質からトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の変換方法。

【請求項17】 組換え型酵素が下記の理化学的性質を有する請求項16に記載の非還元性糖質の変換方法。

(1) 分子量

約57,000乃至68,000ダルトン (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(2) 等電点

約3.3乃至4.6 (等電点電気泳動)

【請求項18】 組換え型酵素が配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列かそれに相同意なアミノ酸配列を有する請求項16又は17に記載の非還元性糖質の変換方法。

【請求項19】 非還元性糖質の濃度が50% (w/w) 以下の水溶液中に組換え型酵素を共存せしめ、温度40乃至55°C、pH5乃至10で作用させる請求項16、17又は18に記載の非還元性糖質の変換方法。

【請求項20】 非還元性糖質がα-グルコシルトレハロース、α-マルトシリルトレハロース、α-マルトトリオシリルトレハロース、α-マルトテトラオシリルトレハロース又はα-マルトペンタオシリルトレハロースである請求項16、17、18又は19に記載の非還元性糖質の変換方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素と、その製造方

法並びに用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】トレハロースは、グルコース2分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる利点がある。しかしながら、従来の製造方法では所望量を入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆どなかった。

【0003】これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭50-154485号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、培養物中の菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭58-216695号公報などにも見られるように、基質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォスフォリラーゼとトレハロース・フォスフォリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの増殖は比較的容易なもの、トレハロースを菌体から採取するのに一連の繁雑な工程を要し、しかも、菌体に含まれるトレハロースが15% (w/w) と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なもの、反応自体が2種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコース磷酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げることが原理的に難しかった。

【0004】斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾビウム・スピーシーズM-11やアルスロバクター・スピーシーズQ36などの微生物がグルコース重合度3以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を產生することが判明した。この知見とあい前後して、この非還元性糖質は、同じくリゾビウム・スピーシーズM-11やアルスロバクター・スピーシーズQ36などが产生する別の酵素により、ほぼ定量的にトレハロースとグルコース及び/又はマルトオリゴ糖に加水分解されることが判明した。これら酵素を併用することにより、澱粉を原料に所望量のトレハロースが比較的容易に得られることとなり、トレハロースに係わる前記課題は悉く解決されていくものと期待される。しかしながら、リゾビウム・スピーシーズM-11もアルスロバクター・スピーシーズQ36もこれら酵素の產生能が充分でなく、トレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を大規模に製造し

ようすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【0005】一方、昨今の組換えDNA技術の進歩には目覚しいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、両酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】この発明の目的は、組換えDNA技術を応用して斯かる酵素を創製することにある。

【0007】この発明の別の目的は、その創製された酵素の製造方法を提供することにある。

【0008】この発明のさらに別の目的は、その創製された酵素を使用する末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質の変換方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素により解決するものである。

【0010】この発明は、前記第二の課題を、その組換え型酵素を産生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法により解決するものである。

【0011】この発明は、前記第三の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質にその組換え型酵素を作用させて該非還元性糖質からトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の変換方法により解決するものである。

【0012】

【作用】この発明による組換え型酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に作用してトレハロースを遊離する。

【0013】この発明の製造方法にしたがって形質転換体を培養すれば、所望量の組換え型酵素が比較的容易に得られる。

【0014】この発明の変換方法により、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質は、トレハロースとグルコース及び/又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換される。

【0015】この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はリゾビウム・スピーシーズ

ーズM-11やアルスロバクター・スピーシーズQ36の培養物から得ることができ、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。

(2) 分子量

約57,000乃至68,000ダルトン (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

(3) 等電点

約3.3乃至4.6 (等電点電気泳動)

(4) 至適温度

pH 7.0で30分間インキュベートすると、35乃至45℃付近に至適温度を示す。

(5) 至適pH

40℃で30分間インキュベートすると、pH 6.0乃至7.5付近に至適pHを示す。

(6) 熱安定性

pH 7.0で60分間インキュベートすると、30乃至45℃付近まで安定である。

(7) pH安定性

25℃で16時間インキュベートすると、pH 5.5乃至10.0付近まで安定である。

【0016】次に、リゾビウム・スピーシーズM-11又はアルスロバクター・スピーシーズQ36が産生する酵素(以下、それぞれ「酵素M-1-1」又は「酵素Q-6」と言う。)の理化学的性質を解明すべく行なった実験について説明する。

【0017】

【実験例1 酵素の精製】

【0018】

【実験例1-1 酵素M-11の精製】500ml容三角フラスコに松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)及び磷酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地(pH 7.0)を100mlずつとり、120℃で20分間オートクレープして滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地にリゾビウム・スピーシーズM-11を植菌し、回転振盪下、27℃で24時間種培養した。別途、30l容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を20lとり、滅菌後、上記で得た種培養液を1% (v/v)接種し、液体培地をpH 6乃至8に保ちつつ、30℃で24時間通気攪拌培養した。

【0019】次に、上記で得た培養物約18lを超高压菌体破碎装置により、菌体を破碎後、遠心分離により採

取した上清約16lに硫酸アンモニウムを20%飽和になるように加え、4℃で1時間静置後、遠心分離により沈殿部を除去した。得られた上清に60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、4℃で24時間静置後、沈殿部を遠心分離により採取し、最少量の10mM磷酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、10mM磷酸緩衝液

(pH 7.0)に対して24時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。得られた上清を予め10mM磷酸緩衝液(pH 7.0)により平衡化させておいた東ソーリ

イオン交換クロマトグラフィー用カラム『DEAE-トヨパール』に負荷し、0Mから0.5Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液(pH 7.0)を通液した。溶出液より酵素を含む画分を採取し、2M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液

(pH 7.0)に対して10時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。その後、上清を予め2M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH 7.

0)により平衡化させておいた東ソーリ製疎水クロマトグラフィー用カラム『ブチルトヨパール』に負荷し、2M

から0Mに低下する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに50mM磷酸緩衝液(pH 7.0)を通液した。溶出液から酵素を含む画分を採取し、予め50mM磷酸緩衝液(pH 7.0)により平衡化させておいた東ソーリ製ゲル濾過カラムクロマトグラフィー用カラム『トヨパールHW-55』に負荷し、カラムに50mM磷酸緩衝液(pH 7.0)を通液し、溶出液から酵素を含む画分を採取した。このようにして精製した酵素M-11の比活性は約240単位/mg蛋白質であり、収量は培養物1l当たり約650単位であった。

【0020】なお、この発明を通じて、酵素の活性は次の方法により測定した活性値(単位)で表示する。すなわち、α-マルトトリオシルトレハロースを1.25%

(w/v)含む50mM磷酸緩衝液(pH 7.0)を4mlとり、これに酵素液を1ml加え、40℃で30分間インキュベートして反応させる。そして、反応液を1mlとり、ソモギ・ネルソン法により還元力を測定する。対照には、予め100℃で10分間加熱して失活させた酵素を上記と同様に処理する。当該酵素の1単位とは、上記

条件下において、1分間に1μmo1のグルコースに相当する還元力を増加させる酵素の量と定義する。

【0021】

【実験例1-2 酵素Q36の精製】実験例1-1と同様にアルスロバクター・スピーシーズQ36を培養し、培養物を処理したところ、比活性約450単位/mg蛋白質の精製酵素Q36が、培養物1l当たり、約650単位の収量で得られた。

【0022】

【実験例2 酵素の理化学的性質】

【0023】

【実験例2-1 作用】特願平5-349216号明細書に開示された方法により、 α -グルコシルトレハロース、 α -マルトシルトレハロース、 α -マルトトリオシルトレハロース、 α -マルトテトラオシルトレハロース又は α -マルトペントオシルトレハロースを固形分当たり98%以上含む非還元性糖質を調製した。そして、そのいずれかを基質として50 mM磷酸緩衝液(pH 7.0)に濃度20% (w/v) になるように溶解し、溶液に実験例1で得た精製酵素M-11又は酵素Q36を基質1g当たり2単位加え、40°Cで48時間反応させた。常法により反応物を脱塩した後、和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用カラム『WB-T-330』に

負荷し、溶出液の糖濃度を東ソー製示差屈折計『RI-8012型』でモニターしながら、室温下にてカラムに蒸留水を0.5 ml/分の流速で通液することにより、反応物に含まれる糖質を分離した。別途、非還元性糖質に代えて高純度のマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペントオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースのいずれかを含む水溶液を上記と同様に処理し、処理物を分析して対照とした。表1及び表2に、それぞれ、M-11及びQ36を加えた場合の基質

10 並びに反応物の糖組成を示す。

【0024】

【表1】

基 質	反応物中の糖質	糖組成(%)
α -グルコシルトレハロース	トレハロース	17.5
	グルコース	6.5
	α -グルコシルトレハロース	76.0
α -マルトシルトレハロース	トレハロース	44.3
	マルトース	44.4
	α -マルトシルトレハロース	11.3
α -マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	39.5
	マルトトリオース	60.0
	α -マルトトリオシルトレハロース	0.5
α -マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	34.2
	マルトテトラオース	65.5
	α -マルトテトラオシルトレハロース	0.3
α -マルトペントオシルトレハロース	トレハロース	29.1
	マルトペントオース	70.6
	α -マルトペントオシルトレハロース	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	100.0
マルトテトラオース	マルトテトラオース	100.0
マルトペントオース	マルトペントオース	100.0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	100.0
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	100.0

【0025】

【表2】

基 質	反応物中の糖質	糖組成(%)
α -グルコシルトレハロース	トレハロース	19.3
	グルコース	10.2
	α -グルコシルトレハロース	70.5
α -マルトシルトレハロース	トレハロース	44.5
	マルトース	44.4
	α -マルトシルトレハロース	11.1
α -マルトリオシルトレハロース	トレハロース	38.8
	マルトリオース	60.7
	α -マルトリオシルトレハロース	0.5
α -マルテトラオシルトレハロース	トレハロース	34.1
	マルテトラオース	65.7
	α -マルテトラオシルトレハロース	0.2
α -マルペンタオシルトレハロース	トレハロース	29.3
	マルペンタオース	70.4
	α -マルペンタオシルトレハロース	0.3
マルトリオース	マルトリオース	100.0
マルテトラオース	マルテトラオース	100.0
マルペンタオース	マルペンタオース	100.0
マルヘキサオース	マルヘキサオース	100.0
マルヘptaオース	マルヘptaオース	100.0

【0026】表1及び表2に示すように、酵素M-11

及び酵素Q36は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースとグルコース又はマルトオリゴ糖をほぼ定量的に遊離した。一方、グルコース重合度3以上のマルトオリゴ糖を基質にすると、両酵素とも全く作用を示さなかった。これら的事実は、当該酵素が末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質に選択的に作用し、そのトレハロース残基とグリコシル残基間のグリコシド結合を特異的に加水分解することを示唆している。斯かる酵素作用は未だ報告されておらず、全く新規な作用機序を辿るものと推定される。

【0027】

【実験例2-2 分子量】ユー・ケー・レムリが『ネーチャー』、第227巻、第680~685頁(1970年)に報告している方法に準じて精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、酵素M-1、酵素Q36とも、分子量約57,000乃至68,000ダルトンに相当する位置に単一バンドを示した。なお、このときの分子量マーカは、ミオシン(200,000ダルトン)、 β -ガラクトシダーゼ(116,250ダルトン)、 fosfotriesterase B(97,400ダルトン)、血清アルブミン(66,200ダルトン)及びオボアルブミン(45,000ダルトン)であつ

た。

【0028】

【実験例2-3 等電点】等電点電気泳動法により測定したところ、酵素M-11、酵素Q36とも、約3.3乃至4.6に等電点を示した。

【0029】

【実験例2-4 至適温度】常法により、50mM磷酸緩衝液(pH7.0)中で30分間インキュベートする条件で試験したところ、図1又は図2に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、35乃至45℃付近に至適温度を示した。

【0030】

【実験例2-5 至適pH】常法により、pHの相違する50mM酢酸緩衝液、磷酸緩衝液又は炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、40℃で30分間インキュベートする条件で試験したところ、図3又は図4に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、pH6.0乃至7.5付近に至適pHを示した。

【0031】

【実験例2-6 熱安定性】常法により、50mM磷酸緩衝液(pH7.0)中で60分間インキュベートする条件で試験したところ、図5又は図6に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、30乃至45℃付近まで安定であった。

【0032】

【実験例2-7 pH安定性】常法により、pHの相違する50mM酢酸緩衝液、磷酸緩衝液又は炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、25℃で16時間インキュベートする条件で試験したところ、図7又は図8に示すように、酵素M-11、酵素Q36とも、pH5.5乃至10.0付近まで安定であった。

【0033】

【実験例2-8 N末端アミノ酸配列】常法により、アプライド・バイオシステム製気相プロテイン・シーケンサ『470A型』を使用して分析したところ、酵素M-11は、N末端に配列表における配列番号7に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0034】同様に分析したところ、酵素Q36は、N末端に配列表における配列番号8に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0035】

【実験例2-9 部分アミノ酸配列】実験例1-1で得た精製酵素M-11を適量とり、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して4℃で18時間透析後、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて酵素濃度を約1mg/mlとした。この溶液を約1mlとり、リジルエンドペプチダーゼを10μg加え、30℃で22時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を、予め16%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸により平衡化させておいた資生堂製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『カブセルパックC18』に負荷し、1.6%-(v/v)から6.4%-(v/v)に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約43分後又は約57分後に溶出したペプチド断片(以下、それぞれ「ペプチド断片A」又は「ペプチド断片B」と言う。)を含む画分を採取し、真空乾燥後、50%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例2-8と同様に分析したところ、ペプチド断片A及びBは、配列表における配列番号9及び10に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0036】別途、実験例1-2で得た精製酵素Q36を上記と同様にして部分加水分解し、予め2.4%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸により平衡化させておいた日本ミリポア・リミテッド製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンダパックC18』に負荷し、2.4%-(v/v)から4.4%-(v/v)に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を0.9ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約4分後又は約24分後に溶出したペプチド断片(以下、それぞれ「ペプチド断片C」又は

「ペプチド断片D」と言う。)を含む画分を採取し、真空乾燥後、50%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、上記と同様に分析したところ、ペプチド断片C及びDは、配列表における配列番号11及び12に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0037】以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。なお、リゾピウム・スピーシーズM-11は岡山県岡山市の土壌から分離され、平成4年12月24日以降、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託番号『FERM BP-4130』で寄託されている。一方、アルスロバクター・スピーシーズQ36は岡山県総社市の土壌から分離されたものであり、平成5年6月3日以降、同センターに寄託番号『FERM BP-4316』で寄託されている。同じ出願人による特願平5-340343号明細書には、酵素の性質・性状とともに、両微生物の菌学的性質が詳細に開示されている。

【0039】そこで、本発明者が、実験例2-8又は2-9で明らかにした酵素M-11の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、リゾピウム・スピーシーズM-11の染色体DNAを鋭意検索したところ、配列表における配列番号3に示す塩基配列を有する1,767塩基対からなるDNA断片が得られた。そして、その塩基配列を解読したところ、酵素M-11は589個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0040】一方、酵素Q36の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、アルスロバクター・スピーシーズQ36の染色体DNAを同様に検索したところ、配列表における配列番号4に示す塩基配列を有する1,791塩基対からなるDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、酵素Q36は597個のアミノ酸からなり、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【0041】配列表における配列番号1乃至4に示す塩基配列及びアミノ酸配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

(1) 供与体微生物の培養物から当該酵素を分離し、高度に精製した。精製酵素をプロテアーゼにより部分加水分解後、加水分解物より2種類のペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

(2) 別途、供与体微生物の菌体より染色体DNAを分離し、精製後、制限酵素により部分的に切断した約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。DNAリガーゼにより、このDNA断片を予

め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えDNAを作製した。

(3) 大腸菌に組換えDNAを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより当該酵素をコードするDNAを含む形質転換体を選択した。

(4) 形質転換体から組換えDNAを採取し、プライマーとともにアニーリング後、DNAポリメラーゼを作用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖DNAをジデオキシ・チェーン・ターミネータ法により分析して塩基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列とを比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。

【0042】次の実験例3乃至6では、上記の工程(2)乃至(4)を具体的に説明するが、これら実験例で用いる手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サムブルック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリ・マニュアル』、第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス発行などにも詳述されている。

【0043】

【実験例3 リゾビウム・スピーシーズM-11由来のDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0044】

【実験例3-1 染色体DNAの調製】リゾビウム・スピーシーズM-11をバクト・ニュートリエント・プロス培地(pH7.0)に植菌し、27℃で24時間回転振盪培養した。遠心分離により培養物から菌体を分離し、TES緩衝液(pH8.0)に浮遊させ、リゾチムを0.05% (w/v) 加えた後、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈澱した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液(pH7.1)に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ7.5μg又は12.5μg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。その後、反応物にクロロフォルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈澱を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1mg/mlになるようSSC緩衝液(pH7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

【0045】

【実験例3-2 組換えDNA pBMU27と形質転換体BMU27の調製】実験例3-1で得た精製染色体DNA溶液を約1mlとり、これに制限酵素Sau3

A Iを約35単位加え、37℃で約20分間反応させて染色体DNAを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、プラスミドベクターBlue script II SK (+)を1μgとり、常法により制限酵素Bam HIを作用させて完全に切断した後、上記で得たDNA断片10μgとT4 DNAリガーゼを2単位加え、4℃で一夜静置することによりDNA断片をベクター断片に連結した。そして、得られた組換えDNAに東洋紡績製コンピテンテセル『Epicuri an Coli XL1-Blue』を30μl加え、氷冷下に30分間静置後、42℃に加温し、SOCプロスを加えて37℃で1時間インキュベートすることにより、組換えDNAを大腸菌に導入した。

【0046】上記で得た形質転換体を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド50μg/mlを含む寒天平板培地(pH7.0)に植菌し、37℃で18時間培養後、培地上にナイロン膜を載置し、培地上に形成された約6,000個のコロニーをナイロン膜上に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列における第8乃至13番目のPhe-Asp-Ile-Trp-Ala-Proで表される配列に基づき5'-TTYGAYATHTGGGCNCC-3'で表される塩基配列のプローブ1を化学合成し、同位体³²Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合が認められた14種類の形質転換体を選択した。

【0047】その後、常法により、これら14種類の形質転換体から組換えDNAを採取し、配列表における配列番号10に示すアミノ酸配列における第2乃至6番目のAsp-Trp-Ala-Glu-Alaで表される配列に基づき化学合成した5'-GAYTGGGCNGARGC-3'で表される塩基配列のプローブ2をイーム・サザーン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第98巻、第503~517頁(1975年)に記載されている方法に準じてハイブリダイズさせ、プローブ2と顕著な会合を示した組換えDNAを選択した。以上のようにして選択した組換えDNAと形質転換体を、それぞれ、『pBMU27』又は『BMU27』と命名した。

【0048】上記で得た形質転換体BMU27をアンビシリン100μg/mlを含むL-プロス培地(pH7.0)に植菌し、37℃で24時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常一般のアルカリ法により組換えDNAを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えDNA pBMU27は約5,700塩基対からなり、図9に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図9に示すように、酵素M-11をコード

する1,767塩基対からなるDNAは、制限酵素EcoRVによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【0049】

【実験例3-3 形質転換体BMU27による酵素の产生】松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)、磷酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地をpH 7.0に調整し、アンピシリンを50 μg/m1加え、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、実験例3-2で得た形質転換体BMU27を植菌し、37℃で24時間回転振盪培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物11当たりに換算して、約4,000単位の酵素が产生していた。

【0050】別途、対照として、大腸菌XL1-B1ue株及びリゾビウム・スピーシーズM-11をアンピシリン無含有の同じ組成の液体培地に植菌し、リゾビウム・スピーシーズM-11の場合、培養温度を30℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、リゾビウム・スピーシーズM-11による酵素の产生は培養物11当たり約2,000単位と、形質転換体BMU27と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XL1-B1ue株は、当該酵素を全く產生しなかった。

【0051】その後、形質転換体BMU27が产生した酵素を実験例1-1と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量値約57,000乃至68,000ダルトンを、また、等電点電気泳動で約3.3乃至4.6に等電点を示すなど、酵素M-11と同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えDNA技術によっても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【0052】【実験例4 リゾビウム・スピーシーズM-11に由来する相補鎖DNAの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】実験例3-2で得た組換えDNA pBMU27を、常法に従って、各種制限酵素で分解し、Bluescript II SK (+) にサブクローニングして、塩基配列決定用DNAとした。これら塩基配列決定用DNAを2 μgとり、これに2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートDNAを含む沈殿を採取し、真空乾燥した。このテンプレートDNAに化学合成した5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'で表される塩基配列のプライマー1を50 pmol/m1と、20mM塩化マグネシウムと20mM塩化ナトリウムを含む40mMトリス-塩酸緩衝液 (pH

7.5)を10 μl加え、65℃で2分間インキュベートしてアニーリングした後、dATP、dTTP及びdCTPをそれぞれ7.5 μM含む水溶液を2 μlと、

[α-³²P] dCTP (2mCi/m1)を0.5 μlと、0.1Mジチオスレイトールを1 μlと、1.5単位/m1のT7 DNAポリメラーゼを2 μl加え、25℃で5分間インキュベートすることによりプライマー1を5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。

【0053】次に、上記で得た相補鎖DNAを含む反応物を四等分し、それぞれにddATP、ddCTP、ddGTP及びddTTPのいずれかを8 μMと80 μM dNTPを含む50mM塩化ナトリウム水溶液を2.5 μl加え、37℃で5分間インキュベートして反応させ、20mM EDTA、0.05% (w/v) プロムフェノールブルー及び0.05% (w/v) キシレンシアノールを含む98% (v/v) 水性ホルムアミド溶液を4 μl加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水浴中で3分間加熱後、6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上にとり、約2,000Vの定電圧を印加しながら電気泳動してDNA断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィーした。

【0054】ラジオグラム上に分離したDNA断片を解析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号5に示す2,161塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号5に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号7、9又は10に示す酵素M-11のN末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号7のN末端アミノ酸配列は配列表における配列番号5における第8乃至27番目の配列に、また、配列番号9又は10の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号5における第10乃至30番目又は第493乃至509番目の配列に一致した。これは、酵素M-11が配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有するものであり、リゾビウム・スピーシーズM-11においては、酵素M-11が配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。

【0055】

【実験例5 アルスロバクター・スピーシーズQ36由来のDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製】

【0056】

【実験例5-1 染色体DNAの調製】実験例3-1と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズQ36から染色体DNAを分離・精製し、濃度約1mg/m1になるようにSSC緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、-80℃で凍結した。

【0057】

【実験例5-2 組換えDNA pBRT32と形質転換体BRT32の調製】実験例5-1で得た精製染色体DNA溶液を実験例3-2と同様に部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。その後、T4 DNAリガーゼを使用し、このDNA断片を実験例3-2と同様に制限酵素Bam HIによるベクターBlue script II SK (+)の消化物に連結し、得られた組換えDNAを大腸菌XL1-Bluel株に導入した。得られた形質転換体を実験例3-2と同様に5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシドを含む寒天平板培地で培養し、生成した約5,000個のコロニーをナイロン膜上に固定する一方、配列表における配列番号11に示すアミノ酸配列における第5乃至10番目のMet-Gly-Trp-Asp-Pro-Alaで表される配列に基づき5'-ATGGGN TGGGAYCCNGC-3'で表される塩基配列のプローブ3を化学合成し、同位体³²Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合が認められた10種類の形質転換体を選択した。

【0058】実験例3-2と同様にして、これら10種類の形質転換体から組換えDNAを採取し、これに配列表における配列番号12に示すアミノ酸配列における第8乃至12番目の Tyr-Asp-Val-Trp-Alaで表される配列に基づき化学合成した5'-TAY GAYGTNTGGGC-3'で表される塩基配列のプローブ4をハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えDNAを選択した。以上のようにして選択した組換えDNAと形質転換体を、それぞれ、『pBRT32』又は『BRT32』と命名した。

【0059】その後、この形質転換体BRT32をアンピシリンを含むL-プロス培地で実験例3-2と同様に培養し、培養物より採取した菌体から組換えDNAを溶出させ、精製し、分析したところ、組換えDNA pBRT32は約6,200塩基対からなり、図10に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図10に示すように、酵素Q36をコードする1,791塩基対からなるDNAは、制限酵素Kpn Iによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【0060】

【実験例5-3 形質転換体BRT32による酵素の产生】松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)、磷酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地をpH7.0に調整し、アンピシリンを50μg/ml加え、120℃で20分間加熱滅菌し、冷却後、実験例5-2で得た形質転換体BRT32を植菌し、37℃で24時間回転振盪培養し

た。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物11当たりに換算して、約3,900単位の酵素が產生していた。

【0061】別途、対照として、大腸菌XL1-Bluel株及びアルスロバクター・スピーシーズQ36をアンピシリン無含有の同じ組成の液体培地に植菌し、アルスロバクター・スピーシーズQ36の場合、培養温度を30℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、アルスロバクター・スピーシーズQ36による酵素の產生は培養物11当たり約1,800単位と、形質転換体BRT32と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌XL1-Bluel株は、当該酵素を全く產生しなかった。

【0062】その後、形質転換体BRT32が產生した酵素を実験例1-1と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量値約57,000乃至68,000ダルトンを、また、等電点電気泳動で約3.3乃至4.6に等電点を示すなど、酵素Q36と同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えDNA技術によつても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【0063】

【実験例6 アルスロバクター・スピーシーズQ36に由来する相補鎖DNAの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】実験例5-2で得た組換えDNA pBRT32を実験例4と同様に処理してテンプレートDNAとし、これをプライマー1とともにアニーリング後、T7DNAポリメラーゼを作用させてプライマー1を5'末端から3'末端に向かって伸長させ、相補鎖DNAを生成させた。実験例4と同様に、この相補鎖DNAにジテオキシ・チーン・ターミネータ法を適用し、ラジオグラム上に分離したDNA断片を解析した結果、相補鎖DNAは配列表における配列番号6に示す2,056塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号6に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号8、11又は12に示すN

40 末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号8のN末端アミノ酸配列は配列表における配列番号6における第2乃至21番目の配列に、また、配列番号11又は12の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号6における第470乃至489番目又は第12乃至31番目の配列に一致した。これは、酵素Q36が配列表における配列番号2のアミノ酸配列を有するものであり、アルスロバクター・スピーシーズQ36においては、酵素Q36が配列表における配列番号4に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。

【0064】以上説明したように、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素は、本発明者が長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特的理化学的性質を具備している。この発明は、組換えDNA技術を応用することにより、この酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型酵素とその製造方法並びに用途につき、具体的に説明する。

【0065】この発明でいう組換え型酵素とは、組換えDNA技術により創製され、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素全般を意味する。この発明の組換え型酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号1又は2に示すN末端からのアミノ酸配列かそれに相同意的なアミノ酸配列が挙げられる。配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列に相同意的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の酵素作用を実質的に変えることなく、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列における構成アミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成、培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の酵素作用は保持しているものの、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の產生ことがある。斯かる変異体も、それが末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離するかぎり、当然、この発明の組換え型酵素に包含される。

【0066】この発明による組換え型酵素は、特定のDNAを含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列かそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子の縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてよい。また、DNAが宿主中で実際に当該酵素の產生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは言うまでもない。

【0067】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然

の給源としては、例えば、リゾピウム・スピーシーズM-11(FERM BP-4130)、アルスロバクター・スピーシーズQ36(FERM BP-4316)、ブレビバクテリウム・ヘロボルム(ATCC11822)及びミクロコッカス・ロゼウス(ATCC186)を含むリヒゾピウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、ミクロコッカス属の微生物が挙げられ、これら微生物の菌体からはこの発明のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に植菌し、好気的条件下で約1乃至3日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームやβ-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該DNAを含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、SDSなどの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くて得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈澱、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的のDNAが得られる。一方、DNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0068】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでおり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Bluescript II SK(+)、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRP7、YEP7、pBS7などのプラスミドベクターやλgt·λC、λgt·λB、p11、φ1、φ105などのファージベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌で発現させるにはpBR322、pUC18、Bluescript II SK(+)、λgt·λC及びλgt·λBが好適であり、一方、枯草菌で発現させるにはpUB110、pTZ4、pC194、p11、φ1及びφ105が好適である。pHV14、TRP7、TEP7及びpBS7は、組換えDNAを2種以上の宿主内で増殖させる場合に有用である。

【0069】DNAを斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、DNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び/又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝

子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I型の制限酵素、詳細には、Sau 3 A I、Eco R I、Hind III、Bam H I、Sal I、Xba I、Sac I、Pst

Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0070】このようにして得られる組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質を含む栄養培地で培養し、該非還元性糖質よりトレハロースを遊離するものを選択すればよい。

【0071】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を產生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア若しくはアンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンスティーブリガー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に植菌し、栄養培地を温度25乃至65℃、pH2乃至8に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約1乃至6日間培養すれば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には酵素を精製するための通常一般の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種若しくは2種以上を適宜組合せて適用すればよい。

【0072】前述のとおり、この発明による組換え型酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離すると

いう、従来の酵素には見られない顕著な作用を有する。トレハロースはまろやかで上品な甘味を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。

- 【0073】斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型酵素の基質には α -グルコシルトレハロース、 α -マルトシリルトレハロース、 α -マルトトリオシリルトレハロース、 α -マルトテトラオシリルトレハロース、 α -マルトペントオシリルトレハロースなどの末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の一連の非還元性糖質が用いられる。斯かる非還元性糖質は、澱粉又はアミロペクチン、アミロースなどの澱粉質を酸及び/又はアミラーゼによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉加水分解物に特願平5-349216号明細書に開示されている非還元性糖質生成酵素を作用させることにより得ることができる。斯かる澱粉加水分解物は、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペントオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度3以上のマルトオリゴ糖の1種若しくは2種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミラーゼズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、1988年、バーガモン・プレス発行に記載されている α -アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペントオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、斯かる澱粉加水分解物の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度3以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、ブルラナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、非還元性糖質生成酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。斯かる還元性澱粉糖の1種又は2種以上を濃度50% (w/v)まで含む水溶液に非還元性糖質生成酵素を適量共存せしめ、水溶液を、通常、温度約40乃至55℃に、また、pHを約6乃至8の範囲に保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。
- 【0074】この発明による変換方法においては、通常、基質として上記したような非還元性糖質の1種又は2種以上を含む水溶液にこの発明による組換え型酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、pHに保ちつつ、所望量のトレハロースが遊離するまで反応させる。反応は0.1% (w/w)程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の2% (w/v)以上、望ましくは、5乃至50% (w/w)とするのがよい。反応時の温度とpHは組換え型酵素が失活することなく基質に効率的に作用するレベルに設定され、温度は55℃付近まで、望まし

くは、約40乃至55℃に、また、pHは5乃至10、望ましくは、約6乃至8の範囲に設定される。組換え型酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯かる反応により、非還元性糖質は効率的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換され、 α -マルトトリオシルトレハロースの場合、変換率はほぼ100%に達する。澱粉加水分解物に前記アミラーゼのいずれかと、非還元性糖質生成酵素及び当該組換え型酵素を同時に作用させると、非還元性糖質が生成すると同時にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖に分解されるので、トレハロース含量の高い糖組成物が収量良く、効率的に得られる実益がある。

【0075】この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能ではあるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過・遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的にトレハロースのみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどにより分別沈澱、膜濾過、酵母により発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの1種若しくは2種以上を適用する。大量の反応物を処理するには、例えば、特開昭58-23799号公報や特開昭58-72598号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は擬似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときには、従来、大量入手が難しかったトレハロース含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【0076】斯くして得られるトレハロース及びトレハロースを含む糖組成物は、糖質甘味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、食品一般、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として極めて有用である。

【0077】以下、2～3の実施例により、この発明による組換え型酵素の製造方法と非還元性糖質の変換方法を具体的に説明する。

[0078]

【実施例A-1 組換え型酵素の製造】 500ml容三角フラスコに松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1% (w/v)、磷酸二水素カリウム0.1% (w/v)を含む液体培地 (pH 7.0) を100mlずつとり、アンピシリンを50μg/ml加えた後、120℃で20分間オートクレーブして加熱滅菌

した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地に実験例3-2の方法で得た形質転換体B M U 2 7を植菌し、回転振盪下、27°Cで24時間種培養した。別途、301容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を181とり、アンピシリンを50 μg/m1加え、120°Cで20分間加熱滅菌し、冷却後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、液体培地をpH 6乃至8に保ちつつ、30°Cで24時間通気搅拌培養した。培養物を超音波粉碎して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去

10 後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物 1 l 当りに換算して、約 3,900 単位の酵素が產生していた。この上清を実験例 1-1 の方法により精製したところ、比活性約 290 単位/mg 蛋白質の組換え型酵素を 1 ml 当たり 165 単位含む水溶液が 67 ml 得られた。

[0079]

【実施例A-2 組換え型酵素の製造】実験例5-2の方法により得た形質転換体BRT32を実施例A-1と同様に培養し、培養物を超音波処理して菌体を破碎し、

20 遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物 1 l 当たりに換算して、約 4,000 単位の酵素が產生していた。この上清を実験例 1-1 の方法により精製したところ、比活性約 420 単位/mg 蛋白質の組換え型酵素を 1 ml 当たり 200 単位含む水溶液が 5.5 ml 得られた。

[0080]

【実施例 B - 1 組換え型酵素による非還元性糖質の変換】

-[0-0-8-1]-

30 【実施例B-1 (a) 非還元性糖質生成酵素の調製】
500ml容三角フラスコにマルトース2.0% (w/v)、ペプトン0.5% (w/v)、酵母エキス0.1% (w/v)、磷酸水素二ナトリウム0.1% (w/v) 及び磷酸二水素カリウム0.1% (w/v) を含む液体培地 (pH 7.0) を100mlずつとり、120℃で20分間オートクレーブして滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地にリゾピウム・スピーシーズM-11を植菌し、回転振盪下、27℃で24時間種培養した。別途、301容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を201とり、滅菌後、上記で得た種培養液を1% (v/v) 接種し、液体培地をpH 7乃至8に保ちつつ、30℃で24時間通気攪拌培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、実験例1-1の方法に準じて精製したところ、比活性約195単位/mg蛋白質の非還元性糖質生成酵素が、培養物1l当たりに換算して、約220単位の収量を得られた。

【0082】なお、この発明を通じて、非還元性糖質生成酵素の活性は、次の方法により測定した活性値（単位）で表示する。すなわち、マルトペンタオースを1.

25% (w/v) 含む 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を 4 mL とり、これに酵素液を 1 mL 加え、40°C で 60 分間インキュベートして反応させた後、反応液を 100°C で 10 分間加熱して反応を停止させる。反応液を蒸留水で 10 倍希釈した後、ソモギ・ネルソン法により還元力を測定する。非還元性糖質生成酵素の 1 単位とは、上記条件下において、1 分間にマルトペントオース 1 μmol に相当する還元力を低下させる酵素の量と定義する。

【0083】

【実施例 B-1 (b) トレハロースを含むシロップ状物の調製】トウモロコシ澱粉を濃度 15% (w/w) になるように水中に懸濁し、懸濁液に炭酸カルシウムを 0.1% (w/w) 加えた。pH 6.0 に調整後、ノボルディスク・インダストリー製 α -アミラーゼ剤『ターマミル 60L』を 0.2% (w/w) 加え、95°C で 15 分間反応させて澱粉を糊化・液化した。液化液を 120°C で 30 分間オートクレーブして酵素を失活させ、45°C に急冷後、澱粉固形分 1 g 当たり、林原生物化学研究所製ブルラナーゼ剤を 1,000 単位、実施例 B-1 (a) で得た非還元性糖質生成酵素を 3.4 単位、実施例 A-1 の方法で得た組換え型酵素を 4.2 単位加え、48 時間反応させた。反応物を 95°C で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して、濃度約 6.0% (w/w) のシロップ状物を澱粉固形分当たり約 9.2% の収量を得た。

【0084】実験例 2-1 の方法により分析したところ、本品は、固形分当たりトレハロースを 70.2%、 α -グルコシルトレハロースを 2.4%、 α -マルトシリルトレハロースを 3.3%、グルコースを 0.7%、マルトースを 10.1%、マルトリオースを 12.9%、グルコース重合度 4 以上のマルトオリゴ糖を 0.4% 含んでいた。まろやかで上品な甘味に加えて適度の保湿性を有し、粘度と還元性が低い本品は、食品一般、化粧品、医薬品などに配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【0085】

【実施例 B-1 (c) トレハロースを含む粉状物の調製】東京有機化学工業製強酸性カチオン交換樹脂『XT-1016 (Na⁺)』を内径 5.4 cm、長さ 5 m のジャケット付きステンレス製カラム 4 本に均一に充填し、カラムを直列に連結して全長を 20 m とした。カラム内温度を 55°C に保ちつつ、実施例 B-1 (b) で得たシロップ状物を樹脂に対して約 5% (v/v) の割合で負荷し、55°C の温水を SV0.3 の流速で通液してシロップ状物中の糖質を分画した。溶出液の糖組成を分析し、トレハロース含量の高い画分のみを採取し、濃縮し、真空乾燥し、破碎して、固形分当たりトレハロースを約 9.7% 含む粉状物を原料固形分当たり約 5.6% の收

率を得た。

【0086】まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性を有しない本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【0087】

【実施例 B-1 (d) 結晶性トレハロース粉状物の調製】実施例 B-1 (c) で得たトレハロース含量の高い画分を一部とり、濃度約 7.5% (w/w) に濃縮後、助晶罐に移し、種晶としてトレハロース含水結晶を固形分当たり約 2% 加え、緩やかに攪拌しながら助晶して結晶化度約 45% のマスキットを得た。このマスキットを約 150 kg/cm² の圧力下、噴霧乾燥塔の上部に設けた噴霧ノズルより噴霧乾燥塔の下方に向かって噴霧する一方、約 85°C の温風を噴霧乾燥塔の上部から下方に向かって送風しつつ、噴霧乾燥塔の底部に設けたベルトコンベア上に蓄積した結晶性粉状物を噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、粉状物を熟成塔に移し、約 40°C の温風を送風しながら 10 時間熟成して結晶化と乾燥を完了した。このようにして、トレハロース含水結晶からなる粉状物を原料固形分当たり約 9.0% の収量を得た。

【0088】まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性や吸湿性を有しない本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【0089】

【実施例 B-2 組換え型酵素による非還元性糖質の変換】馬鈴薯澱粉を濃度 6% (w/w) になるように水中に懸濁し、加熱糊化後、温度 50°C、pH 4.5 に調整し、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分 1 g 当たり 500 単位加え、20 時間反応させた。反応物を pH 6.5 に調整し、120°C で 10 分間オートクレーブして酵素を失活させ、95°C に急冷後、ノボルディスク・インダストリー製 α -アミラーゼ剤『ターマミル 60L』を澱粉固形分当たり 0.1% (w/w) 加え、15 分間反応させた。反応物を 130°C で 30 分間加熱して酵素を失活させ、45°C に急冷後、澱粉固形分 1 g 当たり、実施例 B-1 (a) の方法で得た非還元性糖質生成酵素を 4.1 単位、実施例 A-2 の方法で得た組換え型酵素を 4.9 単位加え、64 時間反応させた。反応物を 95°C で 10 分間加熱して酵素を失活させ、55°C に急冷し、pH 5.0 に調整後、ナガセ生化学工業製グルコアミーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分 1 g 当たり 10 単位加え、40 時間反応させた。反応物を 95°C で 10 分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して、固形分当たりトレハロースを 80.5% 含む濃度約 6.0% (w/w) のシロップ状物を得た。このシロップ状物を濃度約 8.4% (w/w) まで濃縮後、助晶罐に移し、種晶とし

トレハロース含水結晶を固形分当たり約2%加え、緩やかに攪拌しながら助晶して結晶化度約45%のマスキットを得た。このマスキットをプラスチック製バットに分注し、室温で3日間静置して固化・熟成させた後、バットからブロック状物を取り出し、切削機により破碎したところ、トレハロース含水結晶を含む固状物が澱粉固形分当たり約90%の収量で得られた。

【0090】実質的な吸湿性を有さず、取扱い易い本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

[0 0 9 1]

【実施例B-3 組換え型酵素による非還元性糖質の変換】馬鈴薯澱粉を濃度6% (w/w) になるように水中に懸濁し、ナガセ生化学工業製 α -アミラーゼ剤『ネオスピターゼ』を0.01% (w/w) 加え、pH 6.2に調整後、温度85乃至90℃に保ちつつ20分間反応させて澱粉を糊化・液化させた。液化液を120℃で10分間加熱して酵素を失活させ、45℃に急冷後、澱粉固形分1g当たり、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を500単位、実施例B-1(a)の方法で得た非還元性糖質生成酵素を3.2単位、実施例A-1の方法で得た組換え型酵素を5.0単位加えて48時間反応させた。反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、55℃に急冷後、pH 5.0に調整し、ナガセ生化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分1g当たり10単位加えて40時間反応させた。反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、-イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃度約60% (w/w) まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを78.3%含むシロップ状物を得た。このシロップ状物を強酸性カチオン交換樹脂としてオルガノ製『CG6000(Na')』を使用した以外は実施例B-1(c)と同様に分画して、固形分当たりトレハロースを約95%含む画分を得た。この画分を濃度約75% (w/w) に濃

配列

Ala Lys Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Leu Leu Ala Gly Gly Glu Arg Tyr Glu Met Gly Arg Arg
 20 25 30
 Pro Gly Asn Gly Pro Ala Asp Glu Gly Trp Trp Thr Ala Ala Asp Ala Pro
 35 40 45 50
 Thr Gly Ala Asp Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Ile Pro
 55 60 65
 Leu Pro Asp Pro Arg Thr Arg Arg Gln Pro Glu Gly Val His Ala Leu Ser
 70 75 80 85
 Arg Thr Phe Asp Pro Gly Ala His Arg Trp Gln Asp Ala Gly Trp Gln Gly
 90 95 100
 Arg Glu Leu Gln Gly Ser Val Ile Tyr Glu Leu His Ile Gly Thr Phe Thr

縮後、実施例B-2と同様に助晶し、得られたマスキットのブロック状物を破碎してトレハロース含水結晶を含む粉状物を澱粉固形分当たり約70%の収率で得た。

【0092】実質的な吸湿性を有さず、取扱い易い本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

[0093]

【発明の効果】以上説明したように、この発明は、末端

- 10 にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換えDNA技術により、斯かる酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明による組換え型酵素を使用する変換方法により、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質は効率的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換される。非還元性糖質から遊離したトレハロースは、まろやかで上品な甘味を有し、しかも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく食品一般を甘味付けできる実益がある。加えて、この発明による組換え型酵素は、全アミノ酸配列までが明らかにされた酵素であり、食品等への配合使用を前提とするトレハロースの製造に安心して使い得るものである。

【0094】この発明は斯くも顯著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

-{0-0-9-5}-

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ : 589

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

29

30

105	110	115
Pro Glu Gly Thr Leu Asp Ala Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly		
120	125	130
Leu Gly Ile Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr		
140	145	150
His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His Glu Gly Tyr		
155	160	165
Gly Gly Pro Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala His Ala Ala Gly		
175	180	185
Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro Ser Gly Asn		
190	195	200
Tyr Leu Pro Arg Tyr Gly Pro Tyr Leu Lys His Gly Glu Gly Asn Thr Trp		
205	210	215
Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly Ser Asp His Val Arg Gln Tyr		
225	230	235
Ile Leu Asp Asn Val Ala Met Trp Leu Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu		
240	245	250
Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu		
260	265	270
Glu Glu Phe Gly Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ser Ser Glu Gly Gly Arg Pro		
275	280	285
Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro		
290	295	300
Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His		
310	315	320
His Ala Val His Val Asn Val Ser Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp		
325	330	335
Phe Asp Ser Leu Gly Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His		
345	350	355
Asp Gly Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Gly Arg Cys His Gly Arg Pro Ile Asn		
360	365	370
Phe Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp		
375	380	385
Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Ser Leu Pro Tyr		
395	400	405
Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro		
410	415	420
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Thr Thr Pro Trp Gln Phe Phe		
430	435	440
Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ile		
445	450	455
Arg Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln		
460	465	470
Asp Pro Glu Thr Phe Thr Arg Ser Lys Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ser Ala		
480	485	490
Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Ser Leu Ile Thr Leu Arg		
495	500	505
Arg Ser Thr Pro Glu Leu Ala Arg Leu Gly Phe Ala Asp Thr Ala Val Glu		
515	520	525
Phe Asp Asp Asp Ala Arg Trp Leu Arg Tyr Trp Arg Gly Gly Val Gln Val		

31

32

530	535	540
Val Leu Asn Phe Ala Asp Arg Pro Ile Ser Leu Asp Arg Pro Gly Thr Ala		
545	550	555
Leu Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala Val Arg Met Asp Gly Val Gin Val Glu		
565	570	575
Leu Pro Pro Leu Ser Ala Ala Val Leu Arg Asp		
580	585	

【0096】配列番号：2

配列の長さ：597

配列の型：アミノ酸

10

トボロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro Ala Arg		
1	5	10
Tyr Asp Val Trp Ala Pro Asn Ala Glu Ser Val Thr Leu Leu Ala Gly Gly		
20	25	30
Glu Arg Tyr Ala Met Gin Arg Arg Ala Glu Thr Gly Pro Glu Asp Ala Gly		
35	40	45
Trp Trp Thr Ala Ala Gly Ala Pro Thr Asp Gly Asn Val Asp Tyr Gly Tyr		
55	60	65
Leu Leu Asp Gly Asp Glu Thr Pro Leu Pro Asp Pro Arg Thr Arg Arg Gin		
70	75	80
Pro Asp Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr Phe Asp Pro Ser Ala Tyr Ser		
90	95	100
Trp Gln Asp Asp Ala Trp Gln Gly Arg Glu Leu Gln Gly Ala Val Ile Tyr		
105	110	115
Glu Leu His Leu Gly Thr Phe Thr Pro Glu Gly Thr Leu Glu Ala Ala Ala		
120	125	130
Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly Leu Gly Val Asp Phe Ile Glu Leu Leu		
140	145	150
Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln		
155	160	165
Trp Phe Ala Val His Glu Asp Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe		
175	180	185
Val Asp Ala Ala His Ala Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr		
190	195	200
Asn His Leu Gly Pro Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Phe Gly Pro Tyr Leu		
205	210	215
Lys Gln Gly Glu Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro		
225	230	235
Gly Ser Asp His Val Arg Arg Tyr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Met Trp Leu		
240	245	250
Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys		
260	265	270
Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Asp Phe Gly Ala Leu Ala Asp Gln		
275	280	285
Ile Ser Ala Glu Val Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp Leu		
290	295	300
Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly Leu Glu		
310	315	320
Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His Val Asn Val Thr Gly		

33			34
325	330	335	340
Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser Leu Ala Ala Leu Ala Lys			
345	350	355	
Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Glu			
360	365	370	
Arg His His Gly Arg Pro Ile Asn Phe Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu			
375	380	385	390
Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp			
395	400	405	
Arg Leu Ser Gln Thr Leu Pro Tyr Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu			
410	415	420	425
Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro Met Leu Leu Met Gly Glu Glu Tyr Gly			
430	435	440	
Ala Ser Thr Pro Trp Gln Phe Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly			
445	450	455	
Lys Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ile Lys Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp			
460	465	470	475
Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Arg Arg Ser Lys			
480	485	490	
Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ala Glu Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu			
495	500	505	510
Tyr Arg Ser Leu Thr Ala Leu Arg Arg Ser Thr Pro Asp Leu Thr Lys Leu			
515	520	525	
Gly Phe Glu Asp Thr Gln Val Ala Phe Asp Glu Asp Ala Arg Trp Leu Arg			
530	535	540	
Phe Arg Arg Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Asn Phe Ser Glu Gln Pro Val			
545	550	555	560
Ser Leu Asp Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala Val			
565	570	575	
Arg Leu Glu Gly Glu Arg Ala Glu Leu Gly Pro Leu Ser Ala Ala Val Val			
580	585	590	595
Ser Asp			

【0097】配列番号：3

配列の型：核酸

配列の長さ：1767

トポロジー：直鎖状

配列

GCCAAGCCGG TGCAGGGAGC GGGGCCCTTC GATATCTGGG CGCCCCGAGGC AGGCACCGTA 60
 ACGCTGCTGG CCGCGGGGA GCGCTACGAG ATGGGCCGCC GCCCCGGCAA CGGGCCGGCG 120
 GACGAAGGCT GGTGGACGGC CGCGGATGCA CCGACAGGCG CGGACGTGGA CTACGGATAC 180
 CTGCTCGACG GCGACGAAAT CCCGCTGCCG GACCCCCGGA CCCGCCGCCA GCCCCGAAGGC 240
 GTCCATGCCCG TGTCCCGGAC CTTCGACCCCC GGCGCCACC GCTGGCAGGA CGCCGGGTGG 300
 CAGGGCAGGG AACCTCCAGGG CTCCGTGATT TACGAACTCC ACATCGGAAC GTTCACGCCG 360
 GAAGGGACGC TGGAACGCCGC CGCGGGCAAG CTGGACTTACCC TCGCCGGCCT GGGCATCGAC 420
 TTCATTGAGC TGCTGCCCGT GAATGCCCTTC AACGGCACGC ACAACTGGGG CTACGACGGC 480
 GTCCAGTGGT TTGCCGTGCA TGAAGGCTAC GGCGGGCCTG CGCGCTACCA GCGGTTCTG 540
 GATGCCGCC ACCGCCGCCGG CCTCGGCCTC ATCCAGGACG TGGTCTACAA CCACCTCGGG 600
 CCGAGCGGGA ACTACCTCCC CAGGTACGGC CCGTACCTCA AGCACGGCGA AGGCAACACC 660
 TGGGGCGATT CGGTCAACCT GGACGGGGCGG GGATCCGACC ACGTCCGCCA GTACATCCTG 720
 GACAACGTGG CCATGTGGCT GCGCGACTAC CGGGTGGAGC GCCTCCGCCG GGACGCCGTC 780
 CACGCCCTGA AGGATGAGCG GGGCGTCCAC ATCCTGGAGG AGTTGGCCG GCTGGCCGAC 840
 GCCCTGTCTG CCGAAGCCGG CCGCCCGCTG ACCCTCATCG CCGAGTCCGA CCTCAACAAT 900

35

CCGGGGCTGC TGTACCCCCG GGATGTCAAC GGCTACGGAC TGGCCGGCCA GTGGAGCGAC 960
 GACTTCCACC ACGCCGTGCA CGTCACAGTC AGCGGGAAA CCACCGGCTA CTACAGCGAC 1020
 TTCGACTCGC TCGGAGCCCT CGCCAAAGGTC CTGCGTGACG GGTTCTTCCA CGACGGCAGC 1080
 TACTCCAGCT TCCCGGGCCG CTGCCACGGC CGGCCGATCA ACTTCAGCGC CGTGCATCCG 1140
 GCGCGCTGG TGGTCTGTC ACAGAACCAT GACCAGATCG GCAACCGGGC CACCGGGGAC 1200
 CGGCTGTCCC AGTCACTTCC GTACGGCAGC CTGGCCCTGG CGGCCGTGCT GACCCTCAC 1260
 GGTCCGTTCA CGCCCATGCT GTTCATGGGA GAGGAATACG GGGCCACCAC CCCGTGGCAG 1320
 TTCTTCACCT CGCACCCCTGA ACCCGAGCTG GCCAAGGCCA CGGCCGAGGG CAGGATCAGG 1380
 GAGTTGAGC GCATGGGTG GGATCCCGCC GTCGTCCCCG ATCCGCAGGA TCCGGAGACC 1440
 TTCACCCGCT CCAAACATGGA CTGGGCGGAA CGCTCCGCCG GCGATCATGC CGGCCTCCTG 1500
 GAGCTGTACC GCTCGCTTAT CACGCTGCCG CGGTCAACTC CGGAGCTCGC CGGCCTGGC 1560
 TTTGCGGACA CCGCCGTCGA GTTCGACGAC GACGCCCCGCT GGCTCCGTTA TTGGCGGCGA 1620
 GGCCTGCAAGG TGGTGTGAA CTTCGCGAC CGTCCCATCA GCCTGGACCG GCCGGGAACC 1680
 GCGCTGCTGC TCGCCACCGA CGACGCCGTC CGGATGGACG GAGTCCAGGT GGAGCTGCCG 1740
 CGGCTGAGCG CGCGGGTTCT CGCCGAC 1767

【0098】配列番号：4

配列の長さ：1791

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

ACGCACACCT ACCCGCGGGA AGCCGCGAAA CCCGTCTGG GCCCCGCACG CTACGACGTC 60
 TGGCGCCCA ACCTGAATC CGTGACGCTG CTGGCCGGCG GGGAGCGCTA CGCCATGCAG 120
 CGCCGGCCG AGACCGGGCC GGAGGACGCC GGCTGGTGA CGGCCGCCG CGGCCTACG 180
 GATGGCAACG TGGACTACGG GTACCTTCTG GACGGCAGC AAACACCGCT TCCGGATCCA 240
 CGGACCCGCC CCCAGCCCGA CGGCCTCCAC GCCCTGTCCC GCACGTTCGA CCCGTCCGCG 300
 TACAGCTGGC AGGACGACGC CTGGCAGGGC AGGGAACCTGC AGGGCGCCGT CATCTACGAG 360
 CTCCACCTCG GAACATTACAC GCCCAGGGG ACGCTGGAGG CGGCCGCCGG AAAGCTGGAC 420
 TACCTCGCCG GCTTGGCGT CGACTTCATC GAGCTGCTGC CGGTGAACGC TTTCAACGGC 480
 ACGCACAACG GGGGTTACGA CGGTGTCCAG TGGTTCCCTG TGACGAGGC ATACGGCGGG 540
 CGGAAGCGT ACCAGCGGTT CGTCGACGCC GCCCACCCG CAGGCTTGG CGTGATCCAG 600
 GACGTGGTCT ACAACCCACCT CGGCCCGCAGG GGGAACTACCC TGCCCGGTT CGGGCCGTAC 660
 CTCAAGCAGG CGCAGGGTAA CACGTGGGGC GACTCGTGA ACCTGGACGG GCCCGGCTCC 720
 GACCATGTGC GCCGGTACAT CCTGGACAAC CTGGCCATGT GGCTGCGTGA CTACCGGGTG 780
 GACGGCCTGC GGCTGGACGC CGTCCACGCC CTGAAGGATG AGCGGGCGGT GCACATCCTG 840
 GAGGACTTCCG CGGCCGCTGGC CGATCAGATC TCCCGCAGG TGGGACGGCC GCTGACGCTC 900
 ATCGCCGAGT CGCACCTCAA CAACCCCGGG CTGCTGTACC CGCGGGACGT CAACGGGTAC 960
 GGGCTGGAAG GGCAGTGGAG CGACGACTTC CACCAAGCCG TCCACGTCAA CGTCACCGGC 1020
 GAAACCACCG GCTACTACAG TGACTTCGAC TCGCTGGCCG CCCTCGCCAA GGTGCTCCGG 1080
 GACGGCTTCT TCCACGACGG CAGCTACTCC AGCTTCCGGG AACGCCACCA CGGACGGCCG 1140
 ATTAATTCA CGCCCGTACA CCCAGCCGCC CTGGTGTCT GTTCGCGAA CCACGACCAAG 1200
 ATCGGCAACC GTGCCACGGG GGACCGGCTC TCCCAGACCC TGCCGTACGG AACGCTGGCC 1260
 CTCGCTGCGG TGCTGACCCCT GACGGGACCC TTCACGCCA TGCTGCTCAT GGGCGAGGAG 1320
 TACGGCGCCA GCACGCCGTG CGAGTTTTTC ACCTCGCACC CGGAGCCGGA GCTCGGCAAG 1380
 GCCACCGCGG AGGGCCGGAT CAAGGAGTTG GAGCCATGG GGTGGATCC CGCCGTGCG 1440
 CCCGATCCCC AGGATCTGA GACGTCCCGC CGGTCCAAGC TGGACTGGGC GGAAGCCGCC 1500
 GAAGGGGACCC ATGCCCGGCT GCTGGAGCTG TACCGTTCGC TCACCGCCCT GCGCCGCTCC 1560
 ACGCCGGACC TCACCAAGCT GGGCTTCGAG GACACGGCAGG TGGCGTCCGA CGAGGACGCC 1620
 CGCTGGCTGC GTTCCGCGG GGGTGGCGTG CAGGTGCTGC TCAACTTCTC GGAACAGCCC 1680
 GTGAGCCTGG ACCGGGGCGGG CACGGCCCTG CTGCTGGCCA CGGACGACGC CGTCCGGCTA 1740
 GAAGGTGAGC GTGCGGAACG CGGTCCGCTG AGCGCCGCCG TCGTCAGCGA C 1791

【0099】配列番号：5

配列の長さ：2161

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

起源

生物名：リゾビウム・スピーシーズ(Rhizobium sp.)

株名：M-11(FERM BP-4130)

配列の特徴

特徴を表わす記号：5' UTR

存在位置：1..206

特徴を決定した方法：E

特徴を表わす記号：mat peptide

存在位置：207..1994

特徴を決定した方法：S

特徴を表わす記号：3' UTR

存在位置：1995..2161

特徴を決定した方法：E

配列

GGCGCCGGGG	GAGTGCTGGC	GCTTGCCACC	CGGCTCCCCT	ACGGGCTGGA	ACAGTCGGGC	60
GGCTGGCGGG	ACACCGCCGT	CGAGCTTGAA	GCCGCCATGA	CGGACGAACT	GACCGGCTCC	120
ACTTTGGGC	CGGGACCGGC	GGCGCTGTCA	GAAGTCTTCC	GGGCCTACCC	GGTGGCCTTG	180
TTGGTCCCCG	CGACAGGAGG	CAAGTC				206
ATG ACG CAG CCC AAC GAT GCG GCC AAG CCG GTG CAG GGA GCG GGG CGC						254
Met Thr Gln Pro Asn Asp Ala Ala Lys	Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg					
1	5	10	15			
TTC GAT ATC TGG GCG CCC GAG GCA GGC ACC GTA ACG CTG CTG GCC GGC						302
Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Leu Ala Gly						
20	25	30				
GGG GAG CGC TAC GAG ATG GGC CGC CGC CCC GGC AAC GGG CCG GCG GAC						350
Gly Glu Arg Tyr Glu Met Gly Arg Arg Pro Gly Asn Gly Pro Ala Asp						
35	40	45				
GAA GGC TGG TGG ACG GCC GCG GAT GCA CCG ACA GGC GCG GAC GTG GAC						398
Glu Gly Trp Trp Thr Ala Ala Asp Ala Pro Thr Gly Ala Asp Val Asp						
50	55	60				
TAC GGA TAC CTG CTC GAC GGC GAC GAA ATC CCG CTG CCG GAC CCC CGG						446
Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Ile Pro Leu Pro Asp Pro Arg						
65	70	75	80			
ACC CGC CGC CAG CCC GAA GGC GTC CAT GCC CTG TCC CGG ACC TTC GAC						494
Thr Arg Arg Gln Pro Glu Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr Phe Asp						
85	90	95				
CCC GGC GCC CAC CGC TGG CAG GAC GCC GGG TGG CAG GGC AGG GAA CTC						542
Pro Gly Ala His Arg Trp Gln Asp Ala Gly Trp Gln Gly Arg Glu Leu						
100	105	110				
CAG GGC TCC GTG ATT TAC GAA CTC CAC ATC GGA ACG TTC ACG CCG GAA						590
Gln Gly Ser Val Ile Tyr Glu Leu His Ile Gly Thr Phe Thr Pro Glu						
115	120	125				
GGG ACG CTG GAC GCC GCG GGC AAG CTG GAC TAC CTC GCC GGC CTG						638
Gly Thr Leu Asp Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly Leu						
130	135	140				
GGC ATC GAC TTC ATT GAG CTG CTG CCC GTG AAT GCC TTC AAC GGC ACG						686
Gly Ile Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr						
145	150	155	160			
CAC AAC TGG GGC TAC GAC GGC GTC CAG TGG TTT GCC GTG CAT GAA GGC						734
His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His Glu Gly						
165	170	175				
TAC GGC GGG CCT GCG GCG TAC CAG CGG TTC GTG GAT GCG GCC CAC GCG						782
Tyr Gly Gly Pro Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala His Ala						
180	185	190				
GCC GGC CTC GGC GTC ATC CAG GAC GTG GTC TAC AAC CAC CTC GGG CCG						830

39

40

Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro			
195	200	205	
AGC GGG AAC TAC CTC CCC AGG TAC GGC CCG TAC CTC AAG CAC GAC GAA	878		
Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Tyr Gly Pro Tyr Leu Lys His Gly Glu			
210	215	220	
GCC AAC ACC TGG GGC GAT TCG GTC AAC CTG GAC GGG CCG GGA TCC GAC	926		
Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly Ser Asp			
225	230	235	240
CAC GTC CGC CAG TAC ATC CTG GAC AAC GTG GCC ATG TGG CTG CGC GAC	974		
His Val Arg Gln Tyr Ile Leu Asp Asn Val Ala Met Trp Leu Arg Asp			
245	250	255	
TAC CGG GTG GAC GGC CTC CGC CTG GAC GCC GTC CAC GCC CTG AAG GAT	1022		
Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys Asp			
260	265	270	
GAG CGG GCC GTC CAC ATC CTG GAG GAG TTC GGC GCG CTG GCG GAC GCC	1070		
Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Glu Phe Gly Ala Leu Ala Asp Ala			
275	280	285	
CTG TCG TCC GAA GGC GGC CGC CGC CTG ACC CTC ATC GCC GAG TCC GAC	1118		
Leu Ser Ser Glu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp			
290	295	300	
CTC AAC AAT CCG CGG CTG CTG TAC CCC CGG GAT GTC AAC GGC TAC GGA	1166		
Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly			
305	310	315	320
CTG GCC GGC CAG TGG AGC GAC GAC TTC CAC CAC GCC GTG CAC GTC AAC	1214		
Leu Ala Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His Val Asn			
325	330	335	
GTC AGC GGG GAA ACC ACC GGC TAC TAC AGC GAC TTC GAC TCG CTC GGA	1262		
Val Ser Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser Leu Gly			
340	345	350	
GCC CTC GCC AAG GTC CTG CGT GAC GGG TTC TTC CAC GAC GGC AGC TAC	1310		
Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly Ser Tyr			
355	360	365	
TCC AGC TTC CGC GGC CGC TGC CAC GGC CGG CCG ATC AAC TTC AGC GCC	1358		
Ser Ser Phe Arg Gly Arg Cys His Gly Arg Pro Ile Asn Phe Ser Ala			
370	375	380	
GTG CAT CCG GCC GCG CTG GTG GTC TGC TCA CAG AAC CAT GAC CAG ATC	1406		
Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp Gln Ile			
385	390	395	400
GGC AAC CGG GCC ACC GGG GAC CGG CTG TCC CAG TCA CTT CCG TAC GGC	1454		
Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Ser Leu Pro Tyr Gly			
405	410	415	
AGC CTG GCC CTG GCC GTG CTG ACC CTC ACC GGT CCG TTC ACG CCC	1502		
Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro			
420	425	430	
ATG CTG TTC ATG GGA GAG GAA TAC GGG GCC ACC ACC CCG TGG CAG TTC	1550		
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Thr Thr Pro Trp Gln Phe			
435	440	445	
TTC ACC TCG CAC CCT GAA CCC GAG CTG GGC AAG GCC ACG GCC GAG GGC	1598		
Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala Glu Gly			
450	455	460	

41		42	
AGG ATC AGG GAG TTC GAG CGC ATG GGG TGG GAT CCC GCC GTC GTG CCC	1646		
Arg Ile Arg Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro			
465 470 475 480			
GAT CCG CAG GAT CCG GAG ACC TTC ACC CGC TCC AAA CTG GAC TGG GCG	1694		
Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Thr Arg Ser Lys Leu Asp Trp Ala			
485 490 495			
GAA GCG TCC GCC GGC GAT CAT GCC CGC CTC CTG GAG CTG TAC CGC TCG	1742		
Glu Ala Ser Ala Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Ser			
500 505 510			
CTT ATC ACG CTG CGG CGG TCA ACT CCG GAG CTC CGC CGC CTG GGC TTT	1790		
Leu Ile Thr Leu Arg Arg Ser Thr Pro Glu Leu Ala Arg Leu Gly Phe			
515 520 525			
GCG GAC ACC GCC GTC GAG TTC GAC GAC GAC GCC CGC TGG CTC CGT TAT	1838		
Ala Asp Thr Ala Val Glu Phe Asp Asp Asp Ala Arg Trp Leu Arg Tyr			
530 535 540			
TGG CGC GGÀ GGC GTG CAG GTG CTG AAC TTC GCG GAC CGT CCC ATC	1886		
Trp Arg Gly Gly Val Gln Val Val Leu Asn Phe Ala Asp Arg Pro Ile			
545 550 555 560			
AGC CTG GAC CGG CCG GGA ACC GCG CTG CTG CTC GCC ACC GAC GCC	1934		
Ser Leu Asp Arg Pro Gly Thr Ala Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala			
565 570 575			
GTC CGG ATG GAC GGA GTC CAG GTG GAG CTG CCG CCG CTG AGC GCC GCG	1982		
Val Arg Met Asp Gly Val Gln Val Glu Leu Pro Pro Leu Ser Ala Ala			
580 585 590			
GTT CTG CGC GAC		1994	
Val Leu Arg Asp			
595			
TGAGCGTGCG CGCCTTCGGG GCGGGCGTCC TTCCGGTGAC CGGATGCTGG ACCCCCCCCC	2054		
CGCAGCTCCA CAGGGCGCTGG CAGGATGGAA CGTATGACT TTCTGGCAGC GGACAACCGC	2114		
TACGAAACCA TGCCATACCG CGCGGTGGGA CGCAGCGGGC TGAAGCT	2161		

【0100】配列番号：6

配列の特徴

配列の長さ：2056

特徴を表わす記号：5' UTR

配列の型：核酸

存在位置：1..89

鎖の数：二本鎖

特徴を決定した方法：E

トポロジー：直鎖状

特徴を表わす記号：mat peptide

配列の種類：Genomic DNA

存在位置：90..1883

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

起源

特徴を表わす記号：3' UTR

生物名：アルスロバクター・スピーシーズ(Arthrobacter
r sp.)

存在位置：1884..2056

株名：Q36(FERM BP-4316)

40 特徴を決定した方法：E

配列

GCCGGCTTCG GACCGGGGGC ACTGAAGATC GCCGACATCT TCCGGTCGTT CCCCGTTGCG	60
CTGCTGGTGC CGCAGACAGG AGGAGAGTC	89
ATG ACG CAC ACC TAC CCG CGG GAA GCC GCG AAA CCC GTC CTG GGC CCC	137
Met Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro	
1 5 10 15	
GCA CGC TAC GAC GTC TGG GCG CCC AAC GCT GAA TCC GTG ACG CTG CTG	185
Ala Arg Tyr Asp Val Trp Ala Pro Asn Ala Glu Ser Val Thr Leu Leu	

43

44

GCC GGC GGG GAG CGC TAC GCC ATG CAG CGC CGG GCC GAG ACC GGG CCG Ala Gly Gly Glu Arg Tyr Ala Met Gln Arg Arg Ala Glu Thr Gly Pro	233
35 40 45	
GAG GAC GCC GGC TGG TGG ACC GCC GCC GGC GCG CCT ACG GAT GGC AAC Glu Asp Ala Gly Trp Trp Thr Ala Ala Gly Ala Pro Thr Asp Gly Asn	281
50 55 60	
GTG GAC TAC GGG TAC CTT CTG GAC GGC GAC GAA ACA CCG CTT CCG GAT Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Thr Pro Leu Pro Asp	329
65 70 75 80	
CCA CGG ACC CGC CGC CAG CCC GAC GGC GTC CAC GCC CTG TCC CGC ACG Pro Arg Thr Arg Arg Gln Pro Asp Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr	377
85 90 95	
TTC GAC CCG TCC GCG TAC AGC TGG CAG GAC GAC GCC TGG CAG GGC AGG Phe Asp Pro Ser Ala Tyr Ser Trp Gln Asp Asp Ala Trp Gln Gly Arg	425
100 105 110	
GAA CTG CAG GGC GCC GTC ATC TAC GAG CTC CAC CTC GGA ACA TTC ACG Glu Leu Gln Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Leu Gly Thr Phe Thr	473
115 120 125	
CCC GAA GGG ACG CTG GAG GCG GCC GGC GGA AAG CTG GAC TAC CTC GCC Pro Glu Gly Thr Leu Glu Ala Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala	521
130 135 140	
GGC TTG GGC GTC GAC TTC ATC GAG CTG CTG CCG GTG AAC GCT TTC AAC Gly Leu Gly Val Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn	569
145 150 155 160	
GGC ACG CAC AAC TGG GGT TAC GAC GGT GTC CAG TGG TTC GCT GTG CAC Gly Thr His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His	617
165 170 175	
GAG GCA TAC GGC GGG CCG GAA GCG TAC CAG CGG TTC GTC GAC GCC GGC Glu Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala	665
180 185 190	
CAC GCC GCA GGC CTT GCC GTG ATC CAG GAC GTG GTC TAC AAC CAC CTC His Ala Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu	713
195 200 205	
GGC CCC AGC GGG AAC TAC CTG CCG CGG TTC GGG CCG TAC CTC AAG CAG Gly Pro Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Phe Gly Pro Tyr Leu Lys Gln	761
210 215 220	
GGC GAG GGT AAC ACG TGG GGC GAC TCG GTG AAC CTG GAC GGG CCC GGC Gly Glu Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly	809
225 230 235 240	
TCC GAC CAT GTG CGC CGG TAC ATC CTG GAC AAC CTG GCC ATG TGG CTG Ser Asp His Val Arg Arg Tyr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Met Trp Leu	857
245 250 255	
CGT GAC TAC CGG GTG GAC GGC CTG CGG CTG GAC GGC GTC CAC GCC CTG Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu	905
260 265 270	
AAG GAT GAG CGG GCG GTG CAC ATC CTG GAG GAC TTC GGG GCG CTG GCC Lys Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Asp Phe Gly Ala Leu Ala	953
275 280 285	
GAT CAG ATC TCC GCC GAG GTG GGA CGG CCG CTG ACG CTC ATC GCC GAG Asp Gln Ile Ser Ala Glu Val Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu	1001

45

46

290

295

300

TCC GAC CTC AAC AAC CCG CGG CTG CTG TAC CCG CGG GAC GTC AAC GGG 1049

Ser Asp Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly

305 310 315 320

TAC GGG CTG GAA GGG CAG TGG AGC GAC GAC TTC CAC CAC GCC GTC CAC 1097

Tyr Gly Leu Glu Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His

325 330 335

GTC AAC GTC ACC GGC GAA ACC ACC GGC TAC TAC AGT GAC TTC GAC TCG 1145

Val Asn Val Thr Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser

340 345 350

CTG GCC CCC CTC GCC AAG GTG CTC CGG GAC GGC TTC TTC CAC GAC GGC 1193

Leu Ala Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly

355 360 365

AGC TAC TCC AGC TTC CGG GAA CGC CAC GGA CGG CCG ATT AAT TTC 1241

Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Ile Asn Phe

370 375 380

AGC GCC GTA CAC CCA GCC GCC CTG GTG GTC TGT TCG CAG AAC CAC GAC 1289

Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp

385 390 395 400

CAG ATC GGC AAC CGT GCC ACG GGG GAC CGG CTC TCC CAG ACC CTG CCG 1337

Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Thr Leu Pro

405 410 415

TAC GGA AGC CTG GCC CTC GCT GCG GTG CTG ACC CTG ACG GGA CCC TTC 1385

Tyr Gly Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe

420 425 430

ACG CCC ATG CTG CTC ATG GGC GAG GAG TAC GGC GCC AGC ACG CCG TGG 1433

Thr Pro Met Leu Leu Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Ser Thr Pro Trp

435 440 445

CAG TTT TTC ACC TCG CAC CCG GAG CCG GAG CTC GGC AAG GCC ACC GCG 1481

Gln Phe Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala

450 455 460

GAG GGC CGG ATC AAG GAG TTC GAG CGC ATG GGG TGG GAT CCC GCC GTC 1529

Glu Gly Arg Ile Lys Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val

465 470 475 480

GTG CCC GAT CCC CAG GAT CCT GAG ACG TTC CGC CGG TCC AAG CTG GAC 1577

Val Pro Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Arg Arg Ser Lys Leu Asp

485 490 495

TGG GCG GAA GCC GCC GAA GGC GAC CAT GCC CGG CTG CTG GAG CTG TAC 1625

Trp Ala Glu Ala Ala Glu Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr

500 505 510

CGT TCG CTC ACC GCC CTG CGC CGC TCC ACG CCG GAC CTC ACC AAG CTG 1673

Arg Ser Leu Thr Ala Leu Arg Arg Ser Thr Pro Asp Leu Thr Lys Leu

515 520 525

GGC TTC GAG GAC ACG CAG GTG GCG TTC GAC GAG GAC GCC CGC TGG CTG 1721

Gly Phe Glu Asp Thr Gln Val Ala Phe Asp Glu Asp Ala Arg Trp Leu

530 535 540

CGG TTC CGC CGG GGT GGC GTG CAG GTG CTG CTC AAC TTC TCG GAA CAG 1769

545 550 555 560

CCC GTG AGC CTG GAC GGG GCG GGC ACG GCC CTG CTG CTG CCC ACC GAC 1817

Pro Val Ser Leu Asp Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Ala Thr Asp

47

48

565	570	575
GAC GCC GTC CGG CTA GAA GGT GAG CGT GCG GAA CTC GGT CCG CTG AGC 1865		
Asp Ala Val Arg Leu Glu Gly Glu Arg Ala Glu Leu Gly Pro Leu Ser		
580	585	590
GCC GCC GTC GTC AGC GAC 1883		
Ala Ala Val Val Ser Asp		
595		
TGACGTTTTC TTGGGGCCG CGTCCACCCG CGGTGACCCG ATGGTGGACG TCCGCCCCGA 1943		
AGCCTCGGCG CGGCTGGCAG GATGGAACGC ATGACTTATG TGGCCTCGGA CACCCGCTAC 2003		
GACACCATGC CCTACCGCCG CGTCGGACGC AGCGGCCTCA AACTGCCGGC CAT 2056		

【0101】配列番号：7

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Ala Lys Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala			
1	5	10	15
Gly Thr Val			
20			

【0102】配列番号：8

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

20 配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro Ala Arg			
1	5	10	15
Tyr Asp Val			
20			

【0103】配列番号：9

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：21

配列の種類：ペプチドフラグメント型：中間部フラグメント

配列の型：アミノ酸

配列

Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala Gly Thr			
1	5	10	15
Val Thr Leu Leu			
20			

【0104】配列番号：10

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：17

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ser Ala Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu			
1	5	10	15

【0105】配列番号：11

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln Asp			
1	5	10	15
Pro Glu Thr			
20			

【0106】配列番号：12

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：20

50 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

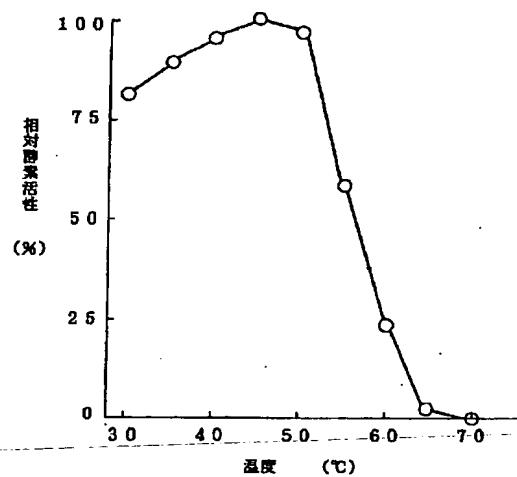
Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Ala	Arg	Tyr	Asp	Val	Trp	Ala	Pro	Asn	Ala	Glu	Ser
1				5					10			15				
Val	Thr	Leu														
			20													

【図面の簡単な説明】

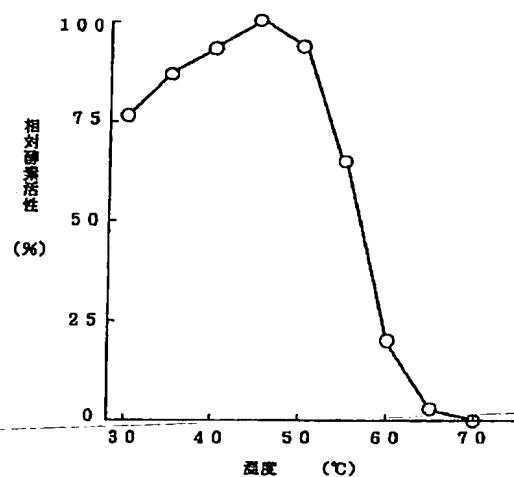
- 【図 1】 酵素M-11の至適温度を示す図である。
 【図 2】 酵素Q36の至適温度を示す図である。
 【図 3】 酵素M-11の至適pHを示す図である。
 【図 4】 酵素Q36の至適pHを示す図である。
 【図 5】 酵素M-11の熱安定性を示す図である。
 【図 6】 酵素Q36の熱安定性を示す図である。
 【図 7】 酵素M-11のpH安定性を示す図である。

フラグメント型：中間部フラグメント

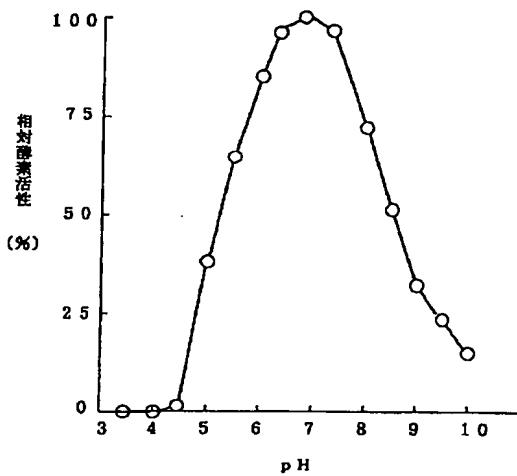
【図 1】



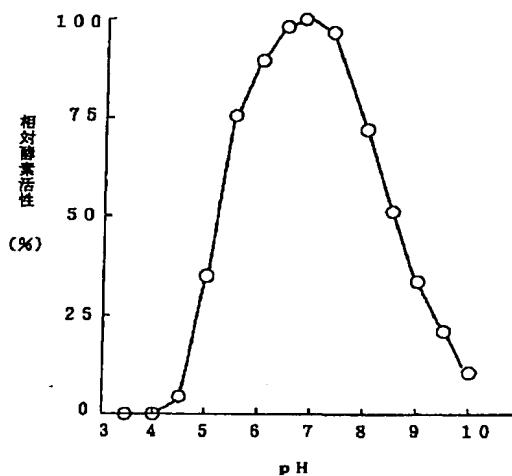
【図 2】



【図 3】

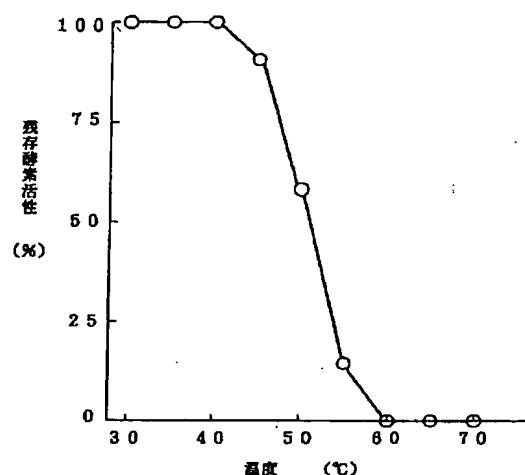


【図 4】

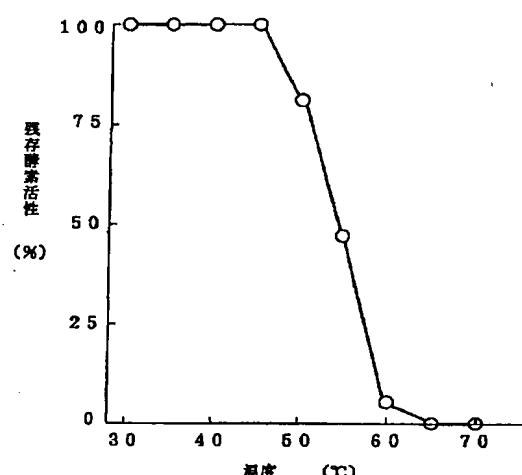


- 【図 8】 酵素Q36のpH安定性を示す図である。
 【図 9】 この発明による組換えDNA pBMU27の制限酵素地図を示す図である。図中、太線で表示した部分は酵素M-11をコードするDNAである。
 【図 10】 この発明による組換えDNA pBRT32の制限酵素地図を示す図である。図中、太線で表示した部分は酵素Q36をコードするDNAである。

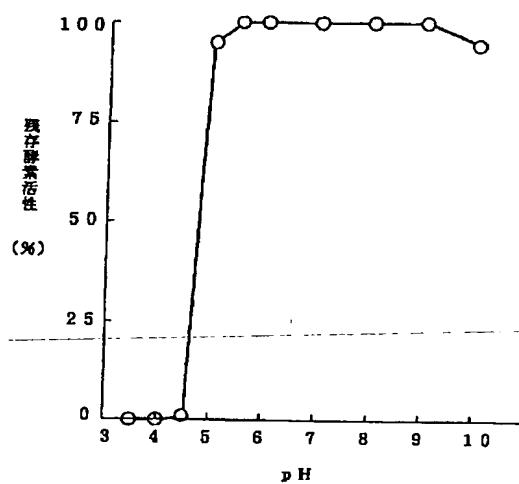
【図 5】



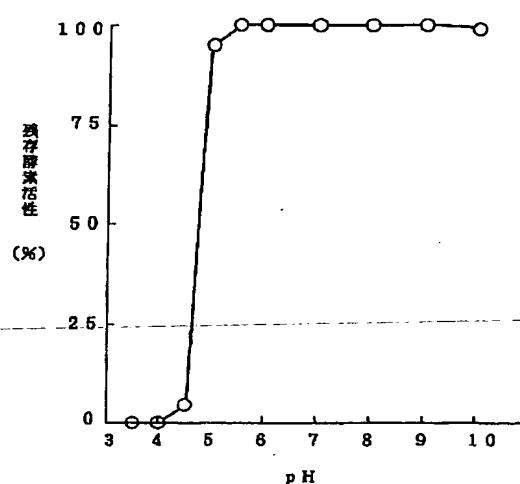
【図 6】



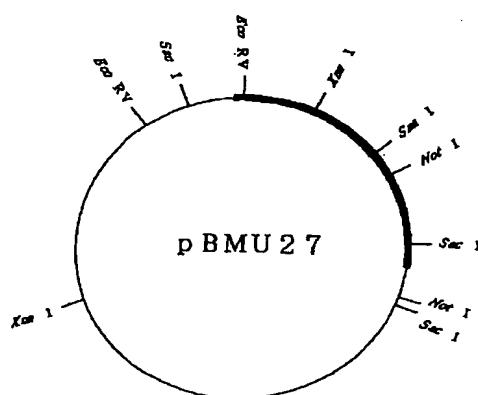
【図 7】



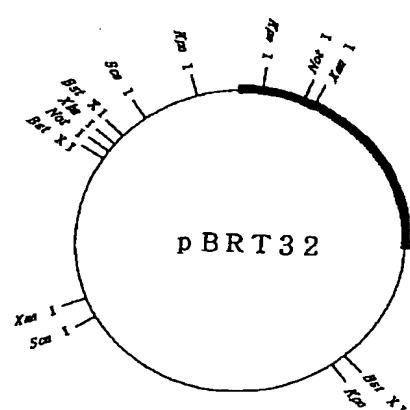
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A61K 7/00	F			
C12N 1/21		8828-4B		
15/09	ZNA			
(C12N 9/24				
C12R 1:19)				
(C12N 1/21				
C12R 1:19)				
(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:41)				
(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:06)				
	9281-4B	C12N 15/00	ZNA	A
		(C12N 15/00	ZNA	A
		C12R 1:41)		
		(C12N 15/00	ZNA	A
		C12R 1:06)		